

Requested Patent: JP8089299A

Title:

HOMOGENEOUS METHOD FOR ASSAY OF DOUBLE-STRANDED NUCLEIC ACIDS USING FLUORESCENT DYES AND KIT USEFUL THEREIN. ;

Abstracted Patent: EP0684316 ;

Publication Date: 1995-11-29 ;

Inventor(s): PATTERSON DAVID R (US); SUTHERLAND JOHN W (US) ;

Applicant(s): JOHNSON JOHNSON CLIN DIAG (US) ;

Application Number: EP19950302921 19950428 ;

Priority Number(s): US19940235396 19940429 ;

IPC Classification: C12Q1/68 ;

Equivalents: CA2148140, CN1114359

ABSTRACT:

A highly sensitive homogeneous assay allows for quantitative detection of amplified nucleic acids. This detection is achieved during or after amplification with a high affinity fluorescent dye which is from the class of unsymmetrical cyanine dyes having at least two positive charges and a binding constant ( $K_b$ ) within the range of from about  $1 \times 10$  to about  $5 \times 10$  (molar). The reagents used for the assay can be contained in a kit designed for amplification such as by polymerase chain reaction.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-89299

(43)公開日 平成8年(1996)4月9日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		A 9453-4B		
C 0 7 D 413/06	2 1 3			
417/06	2 1 3			
C 0 9 B 23/00		K		
		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
			審査請求 未請求 請求項の数20	OL (全 25 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平7-107468	(71)出願人	594199337 ジョンソン エンド ジョンソン クリニカル ダイアグノスティックス, インコーポレイティド アメリカ合衆国, ニューヨーク 14650, ロチェスター, インディゴ クリーク ドライブ 100
(22)出願日	平成7年(1995)5月1日	(72)発明者	ジョン ダブリュ. サザーランド アメリカ合衆国, ニューヨーク 14620, ロチェスター, カルバー ロード 57
(31)優先権主張番号	2 3 5 3 9 6	(72)発明者	デイビッド アール. バターソン アメリカ合衆国, ニューヨーク 14607, ロチェスター, ゼイヤー ストリート 33
(32)優先日	1994年4月29日	(74)代理人	弁理士 石田 敬 (外3名)
(33)優先権主張国	米国 (US)		

(54)【発明の名称】 二本鎖核酸の検出方法及び試験キット

(57)【要約】

【目的】 増幅核酸の定量的検定を可能にする均質系による高感度アッセイ法を提供すること。

【構成】 二本鎖標的核酸を増幅する工程、得られた増幅二本鎖標的核酸と、前記二本鎖標的核酸に結合した場合に前記二本鎖標的核酸の一本鎖に結合されているときに発生する信号又は遊離形における信号と比較して検出可能な信号を示す蛍光色素とを、接触させる工程、並びに前記検出可能な信号を、前記二本鎖標的核酸の存在又は量を示す測定値として検出又は監視する工程を含み、前記蛍光色素が、二本鎖核酸との結合定数が約 $1 \times 10^4$  ~ 約 $5 \times 10^5$  モル<sup>-1</sup>である非対称シアニン系色素である、均質系による二本鎖標的核酸の検出方法。

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 均質系による二本鎖標的核酸の検出方法であって、

A) 二本鎖標的核酸を増幅する工程、

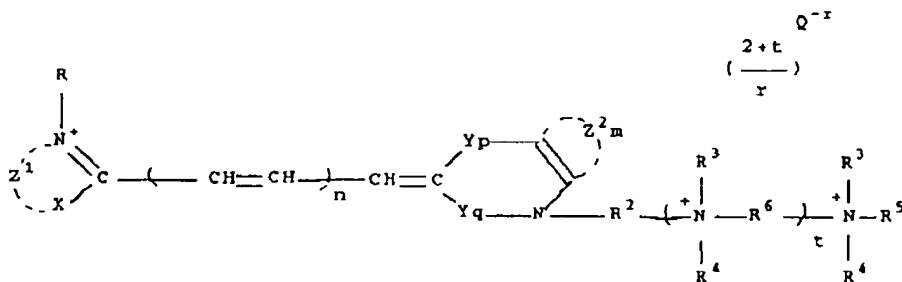
B) 得られた増幅二本鎖標的核酸と、前記二本鎖標的核酸に結合した場合に前記二本鎖標的核酸の一本鎖に結合されているときに発生する信号又は遊離形における信号と比較して検出可能な信号を示す蛍光色素とを、接触さ\*

\*せる工程、並びに

C) 前記検出可能な信号を、前記二本鎖標的核酸の存在又は量を示す測定値として検出又は監視する工程を含み、

前記蛍光色素は、二本鎖核酸との結合定数 ( $K_b$ ) が約  $1 \times 10^4 \sim 約 5 \times 10^5$  モル<sup>-1</sup>である非対称シアニン系色素であって、以下の構造式 (I) :

【化1】



(上式中、Xは-S-、-O-、-Se-、=CH-又は-NR<sup>1</sup>-であり、

Yは-CH=CH-であり、

Rは炭素原子数1～6のアルキルであり、

R<sup>1</sup> は水素又は炭素原子数1～6のアルキルであり、

R<sup>2</sup> 及びR<sup>6</sup> は、各々独立に、炭素原子数1～10のアルキレンであり、

R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup> 及びR<sup>5</sup> は、各々独立に、炭素原子数1～6のアルキルであり、

Z<sup>1</sup> は、5員又は6員の複素環式環を完成するのに必要な炭素原子と異種原子を含み、

Z<sup>2</sup> は、5員又は6員の芳香族環を完成するのに必要な炭素原子と異種原子を含み、

Qは酸アニオンであり、

nは0、1又は2であり、

m、p及びqは、各々独立に、0又は1であるが、但しpとqは同じではなく、

rは1又は2であり、そしてtは0、1又は2である)で示され、

前記検出又は監視は、前記増幅二本鎖標的核酸を捕捉フ

ローブへハイブリダイズすることなく行われる、均質系による二本鎖標的核酸の検出方法。

20 【請求項2】 Xが-S-又は-O-であり、Rが炭素原子数1～3のアルキルであり、R<sup>1</sup> が水素又は炭素原子数1～3のアルキルであり、R<sup>2</sup> が炭素原子数1～4のアルキレンであり、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup> 及びR<sup>5</sup> が、各々独立に、炭素原子数1～3のアルキルであり、Z<sup>1</sup> が、ベンゾオキサゾリウム環又はベンゾチアゾリウム環を完成するのに必要な炭素原子を含み、Z<sup>2</sup> が、ベンゾ環を完成するのに必要な炭素原子を含み、nが0又は1であり、tが0又は1であり、そしてpとqの少なくとも一方は1であるがその両方が共に1であることはない、請求項1記載の方法。

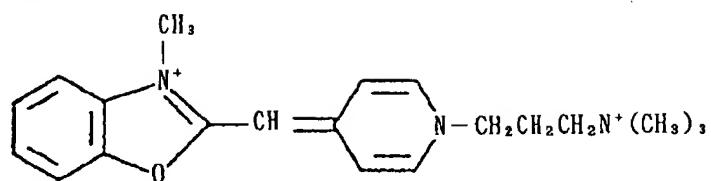
30

【請求項3】 Rがメチル又はエチルであり、R<sup>2</sup> が炭素原子数3のアルキレンであり、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup> 及びR<sup>5</sup> の各々がメチルであり、pが0であり、qが1であり、そしてtが0である、請求項2記載の方法。

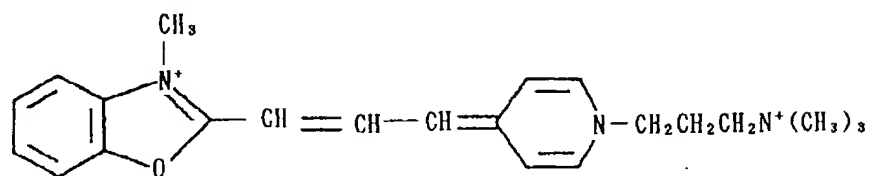
【請求項4】 前記蛍光色素が以下の化合物A～Hのいずれかである、請求項1記載の方法。

【化2】

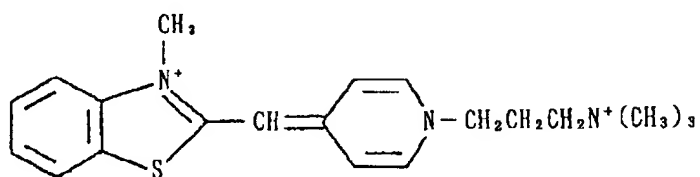
化合物 A :



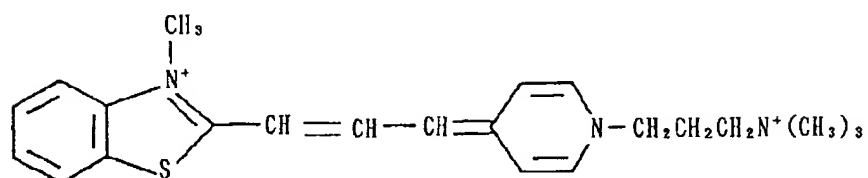
化合物 B :



化合物 C :

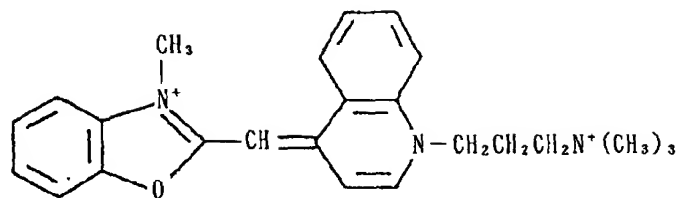


化合物 D :

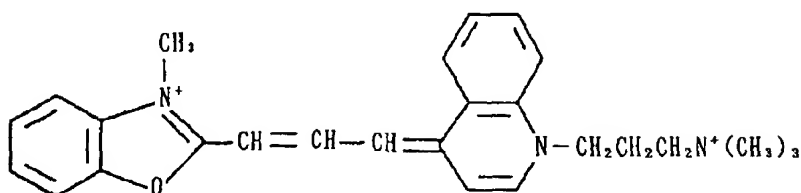


【化3】

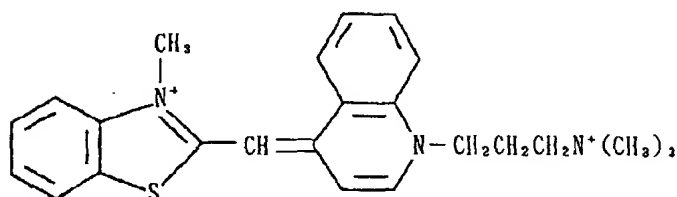
5  
化合物E:



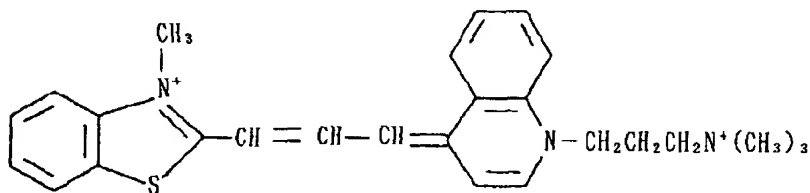
化合物F:



化合物G:



化合物H:



【請求項5】 前記増幅工程(A)をポリメラーゼ連鎖反応により行う、請求項1記載の方法。

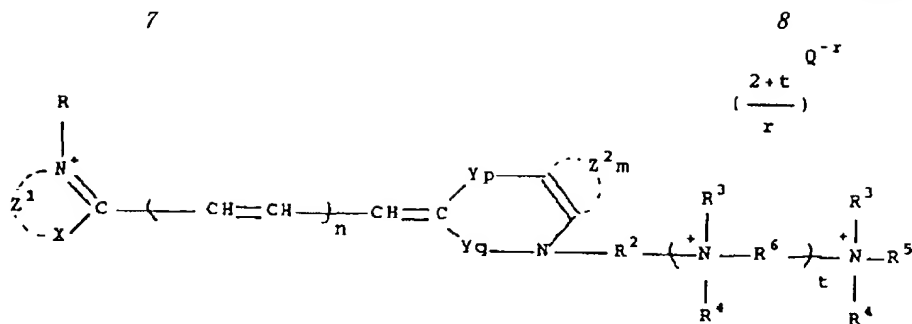
【請求項6】 二本鎖標的核酸の増幅を監視する方法であって、

A) 前記二本鎖標的核酸に結合した場合に前記二本鎖標的核酸の一本鎖に結合されているときに発生する信号又は遊離形における信号と比較して検出可能な信号を示す蛍光色素の存在下で、前記二本鎖標的核酸を増幅する工

程、並びにB) 前記検出可能な信号を、前記二本鎖標的核酸の存在又は量を示す測定値として前記増幅工程中に検出又は監視する工程を含み、

前記蛍光色素は、二本鎖核酸との結合定数( $K_b$ )が約  $1 \times 10^4$  ~ 約  $5 \times 10^5$  モル<sup>-1</sup>である非対称シアニン系色素であって、以下の構造式(I):

【化4】



(上式中、Xは-S-、-O-、-Se-、=CH-又は-NR¹-であり、

Yは-CH=CH-であり、

Rは炭素原子数1～6のアルキルであり、

R¹は水素又は炭素原子数1～6のアルキルであり、

R²及びR⁶は、各々独立に、炭素原子数1～10のアルキレンであり、

R³、R⁴及びR⁵は、各々独立に、炭素原子数1～6のアルキルであり、

Z¹は、5員又は6員の複素環式環を完成するのに必要な炭素原子と異種原子を含み、

Z²は、5員又は6員の芳香族環を完成するのに必要な炭素原子と異種原子を含み、

Qは酸アニオンであり、

nは0、1又は2であり、

m、p及びqは、各々独立に、0又は1であるが、但しpとqは同じではなく、

rは1又は2であり、そしてtは0、1又は2である)で示され、

前記検出又は監視は、前記増幅二本鎖標的核酸を捕捉プ

ロープへ結合させることなく行われる、二本鎖標的核酸の増幅を監視する方法。

【請求項7】 Xが-S-又は-O-であり、Rが炭素原子数1～3のアルキルであり、R¹が水素又は炭素原子数1～3のアルキルであり、R²が炭素原子数1～4のアルキレンであり、R³、R⁴及びR⁵が、各々独立に、炭素原子数1～3のアルキルであり、Z¹が、ベンゾオキサゾリウム環又はベンゾチアゾリウム環を完成するのに必要な炭素原子を含み、Z²が、ベンゾ環を完成するのに必要な炭素原子を含み、nが0又は1であり、tが0又は1であり、そしてpとqの少なくとも一方は1であるがその両方が共に1であることはない、請求項6記載の方法。

【請求項8】 Rがメチル又はエチルであり、R²が炭素原子数3のアルキレンであり、R³、R⁴及びR⁵の各々がメチルであり、pが0であり、qが1であり、そしてtが0である、請求項7記載の方法。

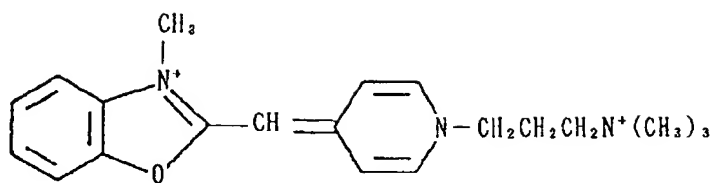
【請求項9】 前記蛍光色素が以下の化合物A～Hのいずれかである、請求項6記載の方法。

【化5】

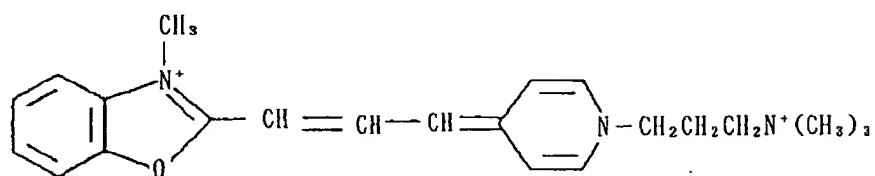
9

10

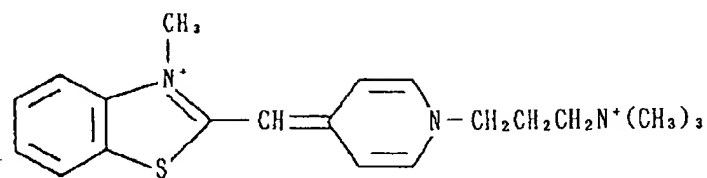
化合物 A :



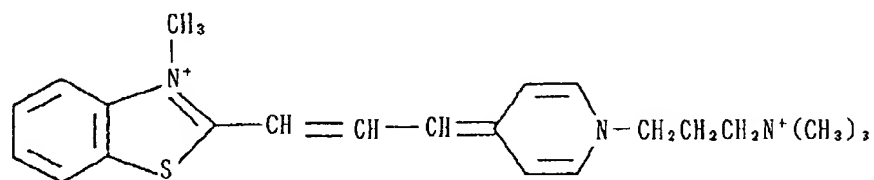
化合物 B :



化合物 C :



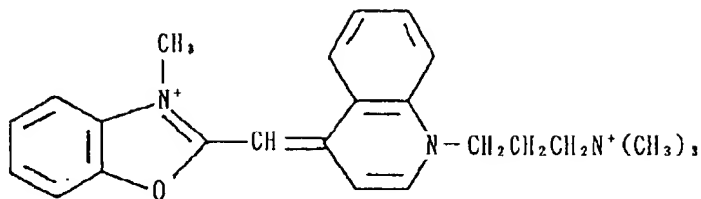
化合物 D :



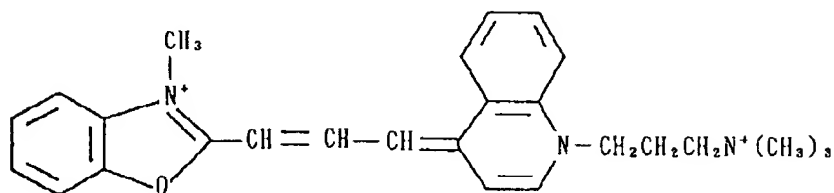
【化6】

11  
化合物 E :

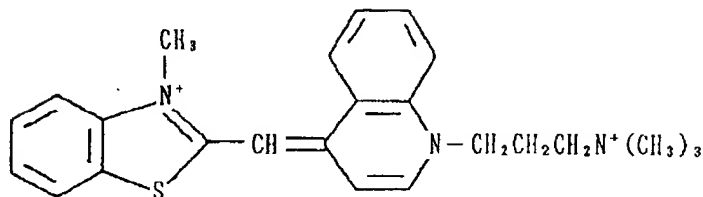
12



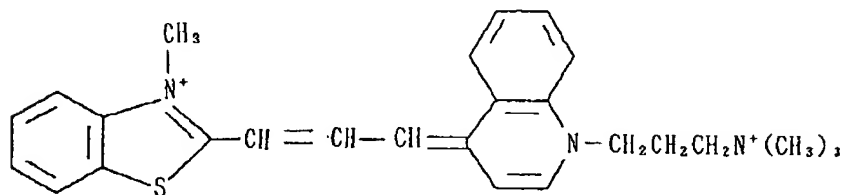
化合物 F :



化合物 G :



化合物 H :



【請求項10】 前記増幅工程(A)をポリメラーゼ連鎖反応により行う、請求項1記載の方法。

【請求項11】 前記蛍光色素が約 $10^{-9}$ モル以上の濃度で存在する、請求項6記載の方法。

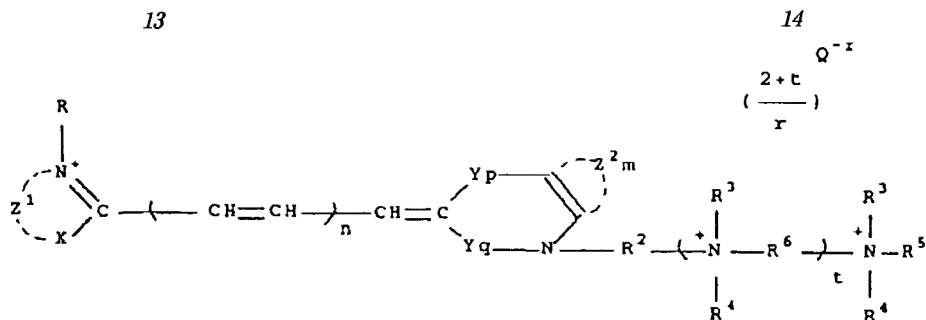
【請求項12】 前記検出可能な信号が発光強度の増加である、請求項6記載の方法。

【請求項13】 1) 二本鎖標的核酸に結合した場合

に、前記二本鎖標的核酸の一本鎖に結合されているときに発生する信号又は遊離形における信号と比較して検出可能な信号を示す蛍光色素であって、二本鎖核酸との結合定数( $K_b$ )が約 $1 \times 10^4$  ~ 約 $5 \times 10^5$  モル $^{-1}$ である非対称シアニン系色素であり、以下の構造式(I) :

【化7】





(上式中、Xは-S-、-O-、-Se-、=CH-又は-NR<sup>1</sup>-であり、

Yは-CH=CH-であり、

Rは炭素原子数1～6のアルキルであり、

R<sup>1</sup>は水素又は炭素原子数1～6のアルキルであり、

R<sup>2</sup>及びR<sup>6</sup>は、各々独立に、炭素原子数1～10のアルキレンであり、

R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>及びR<sup>5</sup>は、各々独立に、炭素原子数1～6のアルキルであり、

Z<sup>1</sup>は、5員又は6員の複素環式環を完成するのに必要な炭素原子と異種原子を含み、

Z<sup>2</sup>は、5員又は6員の芳香族環を完成するのに必要な炭素原子と異種原子を含み、

Qは酸アニオンであり、

nは0、1又は2であり、

m、p及びqは、各々独立に、0又は1であるが、但しpとqは同じではなく、

rは1又は2であり、そしてtは0、1又は2である)で示される蛍光色素、並びに

2) 少なくとも1種の増幅試薬、

を同じ又は別個のパッケージに含む二本鎖標的核酸の均質系による増幅及び検出のための試験キット。

【請求項14】 前記増幅試薬がPCR試薬であり、且つ前記PCR試薬と前記蛍光色素が同じパッケージに含まれた、請求項13記載の試験キット。

【請求項15】 前記PCR試薬が、前記標的核酸に対

するプライマー、耐熱性DNAポリメラーゼ、dNTP又はDNAポリメラーゼコファクターである、請求項14記載の試験キット。

【請求項16】 前記PCR試薬のすべてが同じ緩衝化反応混合物の中にある、請求項15記載の試験キット。

【請求項17】 前記標的核酸の増幅及び検出を行うための反応容器をさらに含む、請求項15記載の試験キット。

20 【請求項18】 Xが-S-又は-O-であり、Rが炭素原子数1～3のアルキルであり、R<sup>1</sup>が水素又は炭素原子数1～3のアルキルであり、R<sup>2</sup>が炭素原子数1～4のアルキレンであり、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>及びR<sup>5</sup>が、各々独立に、炭素原子数1～3のアルキルであり、Z<sup>1</sup>が、ベンゾオキサゾリウム環又はベンゾチアゾリウム環を完成するのに必要な炭素原子を含み、Z<sup>2</sup>が、ベンゾ環を完成するのに必要な炭素原子を含み、nが0又は1であり、tが0又は1であり、そしてpとqの少なくとも一方は1であるがその両方が共に1であることはない、請求項15記載の試験キット。

【請求項19】 Rがメチル又はエチルであり、R<sup>2</sup>が炭素原子数3のアルキレンであり、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>及びR<sup>5</sup>の各々がメチルであり、pが0であり、qが1であり、そしてtが0である、請求項18記載の試験キット。

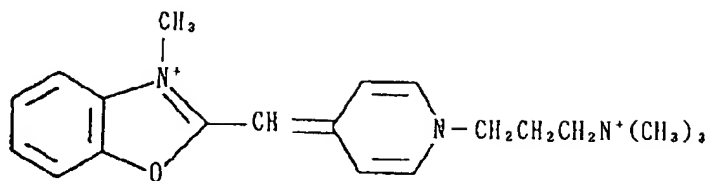
【請求項20】 前記蛍光色素が以下の化合物A～Hのいずれかである、請求項15記載の試験キット。

【化8】

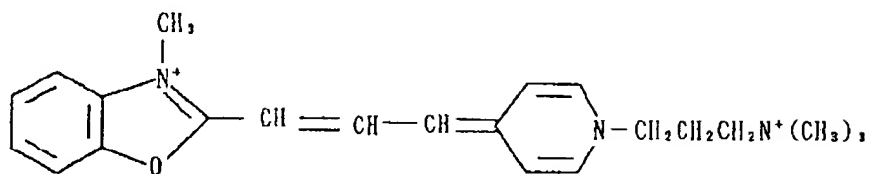
15

16

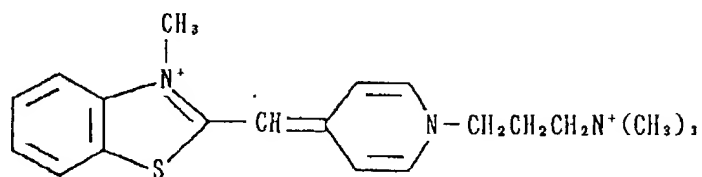
化合物 A :



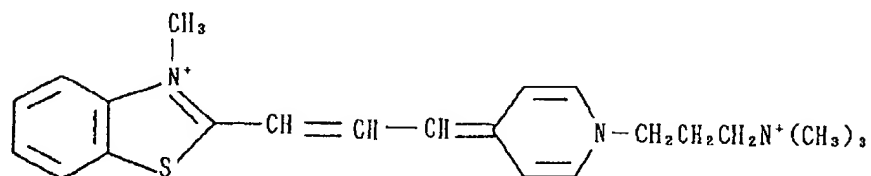
化合物 B :



化合物 C :



化合物 D :

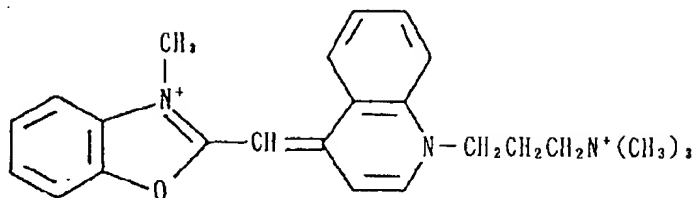


【化9】

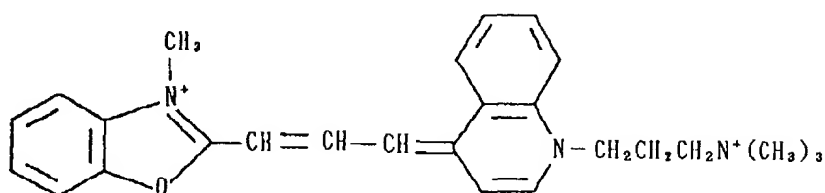
17

18

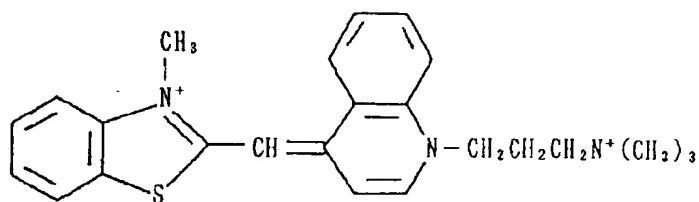
化合物 E :



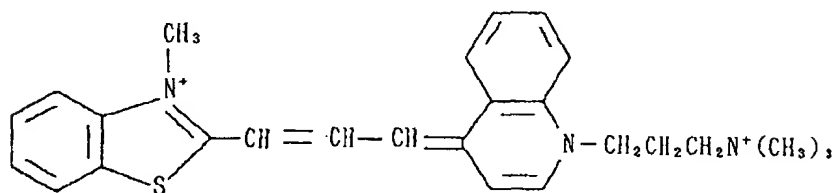
化合物 F :



化合物 G :



化合物 H :



## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、標的とする二本鎖核酸を検出するための均質系によるアッセイ法に関する。このようなアッセイは、各種の診断、調査及び研究手順に、とりわけ感染性因子の検出に有用である。さらに本発明は、このようなアッセイに有用な試験キットにも関する。

## 【0002】

【従来の技術】最近、核酸の検出は、ヒトや動物の被検体中に非常に少量で存在する染色体の特徴、感染性因子及び各種生物を早期に検出するための手段として成長している。検出手順は、通常、(ヌクレオチド対として知

られている) 相補的ヌクレオチド間の水素結合及びその他の力によって2本のDNA鎖と一緒に結合する相補性の概念に基づくものである。DNA分子は、通常はかなり安定であるが、その鎖は、加熱などの特定の条件によって分離又は変性させることができる。変性された鎖は、相補的配列を有する別のヌクレオチド鎖とのみ再会合する。

【0003】分子数の非常に少ないDNAを検出するための方法を見い出すため、多大な研究が行われてきた。検出のために被検体中の核酸数を増幅する又は大幅に増やす各種の手法が知られており、ほぼ10年間にわたり用いられている。このような増幅技法には、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、

その他開発の遅れている方法が含まれる。PCR法が最もよく知られている方法であって、DNA重合剤とデオキシリボヌクレオシド三リン酸を存在させた適当な条件下で標的核酸の鎖にプライマーをハイブリダイズさせる工程を含む。複数回のサイクルを通してプライマー伸長生成物が形成されて、最初の標的鎖の数が指数的に増加することになる。PCRに関する詳細は、米国特許出願第4,683,195号(Mullisら)、同第4,683,202号(Mullisら)及び同第4,965,188号(Mullisら)に記載されている。

【0004】PCRのような増幅手順は少量の標的核酸を検出するための機会を提供するが、同時に、反応容器毎に人工的に発生するオリゴヌクレオチドによる汚染という問題を生ぜしめる。新規被検体の標的核酸と一緒に汚染物が増幅されると、偽陽性の結果が得られる恐れがある。このことは、特に感染性因子を調査する場合に重大な結論をもたらすことがある。このような汚染を減少させるため、当該産業界では物理的封込め法や化学的「滅菌」技法が考えられている。物理的封込め法は利点もあるが、反応容器の設計やエンジニアリングがかなり複雑にならざるをえない。化学的滅菌法については、当該技術分野で議論はされているが、いまだに成功した例はない。

【0005】反応容器毎に汚染性物質について心配することのない増幅方法を簡素化する方法を見出すことは有用である。また、定量性をもつことができる増幅方法があれば望ましい。このような方法は、単なる疾病の検出ではなくその処置にも有用となりうる。

【0006】定量性があると見なされている均質系による増幅方法が、欧州特許出願公開第487218号公報(1992年5月27日、Tosoh)に記載されており、これによると、増幅工程中又は増幅工程後に二本鎖DNAと結合させるための特殊な蛍光色素を使用している。結合による蛍光信号の変化量が、被検体中の標的核酸量に相関していることが明らかである。Tosohの特許出願公開公報において有用であると考えられている種類の蛍光色素は、エチジウムブロミド、アクリジンオレンジ、ビスベンズイミダゾール(例、Hoechst 33258)、ジアミノフェニルインドール、アクチノマイシン、チアゾールオレンジ及びクロモマイシンである。「均質系による」とは、検出すべき標的核酸と非標的物質とを分離する必要のないことを意味する。

【0007】米国特許出願第5,049,490号明細

書(Sutherlandら)に記載されているように、同じ種類の色素がDNAポリメラーゼの検出にも有用である。上記の色素(例えば、エチジウムブロミドやHoechst色素)はDNAに容易に結合するが、それらの使用から明らかなバックグラウンドが高すぎるために有意な感度が得られない場合が多い。このため、DNAに良好に結合はするが、示される感度がより高く且つバックグラウンドがより低くなるような色素を見出すことが望まれている。

10 【0008】増幅された核酸を染色するための感受性色素として、例えば、MansfieldらのBioTechniques 15(2)、第274~279頁(1993)に、ある種のビス挿入性(bis-intercalating)色素が記載されている。このような色素は、核酸を染色するのに有用であり且つ上記のバックグラウンドの問題を克服するものであるが、核酸の増幅工程を阻害するほど強く核酸に結合してしまう。このため、これらの色素は、増幅工程中には使用できず、増幅終了時にしか使用することができない。

【0009】

20 【発明が解決しようとする課題】増幅された標的核酸を定量検出するために封じ込められた系において使用することができ、よって汚染物の問題を防止することができるより感度の高い均質系によるアッセイが望まれる。このようなアッセイは、低濃度の核酸に対して高感度でありしかも製造や使用が容易でなければならない。さらにまた、増幅中に存在するように取り込まれた検出手段によって増幅の進行を監視することができれば望ましい。

【0010】

30 【課題を解決するための手段】上記の問題は、均質系による二本鎖標的核酸の検出方法であって、

A) 二本鎖標的核酸を増幅する工程、

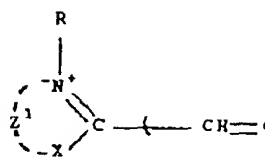
B) 得られた増幅二本鎖標的核酸と、前記二本鎖標的核酸に結合した場合に前記二本鎖標的核酸の一本鎖に結合されているときに発生する信号又は遊離形における信号と比較して検出可能な信号を示す蛍光色素とを、接触させる工程、並びに

40 C) 前記検出可能な信号を、前記二本鎖標的核酸の存在又は量を示す測定値として検出又は監視する工程を含み、前記蛍光色素は、二本鎖核酸との結合定数( $K_b$ )が約 $1 \times 10^4$  ~ 約 $5 \times 10^5$ である非対称シアニン系色素であって、以下の構造式(I)：

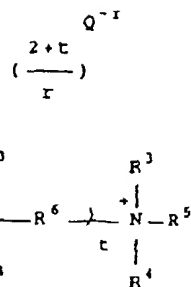
【0011】

【化10】

21



22



【0012】(上式中、Xは-S-、-O-、-Se-、=CH-又は-NR<sup>1</sup>-であり、Yは-CH=CH-であり、Rは炭素原子数1~6のアルキルであり、R<sup>1</sup>は水素又は炭素原子数1~6のアルキルであり、R<sup>2</sup>及びR<sup>6</sup>は、各々独立に、炭素原子数1~10のアルキレンであり、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>及びR<sup>5</sup>は、各々独立に、炭素原子数1~6のアルキルであり、Z<sup>1</sup>は、最大で3個までの芳香族炭素環式環又は複素環式環が縮合されていてもよい5員又は6員の複素環式環を完成するのに必要な炭素原子と異種原子を含み、Z<sup>2</sup>は、最大で2個までの芳香族炭素環式環又は複素環式環が縮合されていてもよい5員又は6員の芳香族環を完成するのに必要な炭素原子と異種原子を含み、Qは酸アニオンであり、nは0、1又は2であり、m、p及びqは、各々独立に、0又は1であるが、但しpとqが同じ値であることはなく、rは1又は2であり、そしてtは0、1又は2である)で示され、前記検出又は監視は、前記増幅二本鎖標的核酸を捕捉プローブへハイブリダイズすることなく行われる、そのような均質系による二本鎖標的核酸の検出方法によって解決された。

【0013】本発明はまた、二本鎖標的核酸の増幅を監視する方法であって、

A) 前記二本鎖標的核酸に結合した場合に前記二本鎖標的核酸の一本鎖に結合されているときに発生する信号又は遊離形における信号と比較して検出可能な信号を示す蛍光色素の存在下で、前記二本鎖標的核酸を増幅する工程、並びに

B) 前記検出可能な信号を、前記二本鎖標的核酸の存在又は量を示す測定値として前記増幅工程中に検出又は監視する工程を含み、前記蛍光色素は、先に前記の方法について記載した通りであり、前記検出又は監視は、前記増幅二本鎖標的核酸を捕捉プローブへ結合させることなく行われる、二本鎖標的核酸の増幅を監視する方法をも提供する。

【0014】さらに本発明は、

1) 二本鎖標的核酸に結合した場合に、前記二本鎖標的核酸の一本鎖に結合されているときに発生する信号又は遊離形における信号と比較して検出可能な信号を示す蛍光色素であって、先に本発明の方法について記載した蛍光色素、及び

2) 少なくとも1種の増幅試薬、を同じ又は別個のパッ

10 ケージに含む二本鎖標的核酸の均質系による増幅及び検出のための試験キットを提供する。

【0015】本発明は、増幅中又は増幅後の標的核酸を検出するための、より簡単な、高感度の、均質系によるアッセイ法を提供するものである。このため、本発明の方法を使用すると、工程中の任意の時点における核酸の量及び増幅を定量的に監視することができる。また、本発明の方法を使用すると、増幅終了時の核酸の量を検出することもできる。本発明の方法は均質系であるため、不均質系で一般的な分離工程や捕捉工程を施す必要もなく、適当な任意の格納容器の中で容易に実施することができる。増幅後に反応容器から試薬を除去する必要がないため、ある容器から別の容器への汚染が回避される。最も重要なことは、本発明のアッセイ法が、エチジウムブロミドやHoescht 33258系色素のような通常の蛍光色素を用いた従来より報告されているアッセイ法よりも、バックグラウンド信号が低いために感度が高いということである。

【0016】これらの利点は、特別な範囲において増幅及び検出される二本鎖核酸に対して高い親和性を有する特殊な蛍光色素を使用することによって達成される。この結合親和性は、多くの通常の蛍光色素よりも高いものであるが、標的核酸の増幅を阻害するほど高いというものではない。これらの色素は、少なくとも2価、すなわち1分子当たり2個以上の陽イオン電荷を有する。これらの色素について以下詳細に説明する。

【0017】ポリメラーゼ連鎖反応を利用して核酸を増幅及び検出するための一般原理及び条件についてはよく知られている。その詳細については、米国特許出願第4,683,195号、同第4,683,202号及び同第4,965,188号明細書(上記)をはじめとする多くの文献に記載されており、本明細書ではそのすべてを参照することにより取り入れることとする。当該技術分野における教示と本明細書に記載した特別な教示とを鑑みれば、当業者であれば本明細書に記載に従い本発明を実施して1種以上の核酸を増幅することは容易である。

【0018】本発明の実施に採用することができる他の増幅方法として、例えば欧州特許出願公開第320308号公報(1987年12月公開)及び同第439182号公報(1990年1月公開)に記載のリガーゼ連鎖

反応、例えば Birkenmeyer らの J. Virology Meth. 35, pp. 117-126 (1991) に記載の自己支持配列複製 (self-sustained sequence replication)、「Gap-PCR」及びその変型並びに当業者には明白であろう他の方法が挙げられる。本明細書の残部は PCR を採用して本発明を実施することに関するが、分子生物学における当業者であれば他の有用な増幅技法へ本明細書の教示をどのように適用できるかについては容易に想到できる。

【0019】本発明は、被検体中の1種以上の標的核酸中に存在する1種以上の特異的な核酸配列を増幅又は検出することに関する。被検体は、細胞、ウイルス、毛髪、体液又は検出可能な遺伝子DNA又はRNAを含有する他の材料であることができる。検出の主な目的は診断用とすることができるが、本発明を利用して、DNAやメッセンジャーRNAのクローニング効率を改善すること、或いは化学合成から得られる核酸混合物から所望の配列を大量に獲得することも可能である。

【0020】増幅される核酸は、プラスミドや、(細菌、酵母、ウイルス、植物、高等動物又はヒトなどの)何らかのソースから得られる天然DNA又はRNAをはじめとする様々なソースから得ることができる。それは、血液、末梢血液単核細胞(PBMC)、当該技術分野で知られている他の組織材料又は他のソースをはじめとする様々な組織から周知の方法で抽出されることができる。本発明は、ゲノムDNA、細菌DNA、菌類DNA、ウイルスRNA、又は細菌若しくはウイルスに感染された細胞中のDNA若しくはRNAに存在する核酸配列の増幅及び検出に特に有用である。さらに、本発明を利用して、癌に係わる核酸を増幅及び検出することも可能である。

【0021】検出可能な細菌には、ヒトの血液中にある細菌、サルモネラ種、クラミジア種、淋菌種、シゲラ種及びマイコバクテリウム種が含まれるが、これらに限定はされない。検出可能なウイルスには、単純ヘルペスウイルス、エプスタインバールウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、ヒトパピローマウイルス、肝炎ウイルス並びにHTLV-I、HTLV-II、HIV-I及びHIV-IIのようなレトロウイルスが含まれるが、これらに限定はされない。原生動物の寄生虫、酵母及びカビもまた検出可能である。当業者であればその他の検出可能な種は明らかである。

【0022】「PCR試薬」とは、PCRに必要と考えられるすべての試薬、すなわち、各標的核酸の対向鎖に対する一組のプライマーと、DNAポリメラーゼと、DNAポリメラーゼコファクターと、2種以上のデオキシリボヌクレオシド-5'-三リン酸とを意味する。「プライマー」とは、核酸鎖(すなわち、鋳型)に相補的なプライマー伸長生成物の合成が誘導される条件下に置かれた場合にその合成開始点として作用しうる、天然の又

は合成されたオリゴヌクレオチドを意味する。このような条件には、他のPCR試薬の存在並びに好適な温度及びpHが含まれる。

【0023】プライマーは、増幅効率を最大限に引き出すためには一本鎖であることが好ましいが、所望であれば二本鎖であってもよい。プライマーは、DNAポリメラーゼの存在下で伸長生成物の合成を引き起こすに十分な長さを有する必要がある。各プライマーの正確なサイズは、使用法、標的配列の複雑さ、反応温度及びプライマーの出所によって変わる。一般に、本発明において用いられるプライマーは、ヌクレオチドを10~60個、好ましくは18~45個有する。

【0024】本発明において用いられるプライマーは、増幅すべき特異的配列の個別の鎖に対して「実質的に相補的」であるように選ばれる。このことは、プライマーがそれぞれの鎖にハイブリダイズするに十分な相補性を示し、所望のハイブリダイズされた生成物を形成した後DNAポリメラーゼによって伸長可能でなければならないことを意味する。プライマーが標的核酸に対して厳密に相補的である状況が好ましく且つ最も実用的である。

【0025】本発明において有用なプライマーは、多数の出所から入手すること、或いは、例えば、ABI DNA合成機(Applied Biosystemより入手可能)又はBiosearch 8600シリーズ若しくは8800シリーズの合成機(Milligen-Biosearch社より入手可能)をはじめとする周知の技法及び装置並びにそれらの使用方法(例えば、上記の米国特許出願第4,965,188号明細書に記載されている)を利用して合成することができる。また、生物学的ソースから単離された天然のプライマー(例えば、制限エンドヌクレアーゼ消化物)も有用である。本明細書で用いる「プライマー」には、プライマーの混合物も含まれる。

【0026】DNAポリメラーゼは、プライマーと鋳型の複合体におけるプライマーの3'-ヒドロキシ末端にデオキシヌクレオシド-リン酸を付加する酵素であるが、この付加は鋳型依存性(すなわち、鋳型における特異的ヌクレオチドに依存する)である。有用なDNAポリメラーゼには、*E. coli*のDNAポリメラーゼI、T4 DNAポリメラーゼ、Klenowポリメラーゼ、逆転写酵素、その他当該技術分野で知られているものが含まれる。

【0027】DNAポリメラーゼは、「耐熱性」であることが好ましい。耐熱性とは、高温、特にDNA鎖の変性に用いられる高温において一般に安定であり且つ優先的に活性であることを意味する。より詳細には、耐熱性DNAポリメラーゼは、PCRに用いられる高温において実質的には不活性化されない。このような温度は、pH、塩濃度、その他当該技術分野で知られている条件を

はじめとする幾つかの反応条件によって変わる。

【0028】当該技術分野では幾つかの耐熱性DNAポリメラーゼが報告されており、米国特許出願第4,965,188号明細書(上記)及び同第4,889,818号明細書(Gelfandら、1989年12月26日発行)に詳細に記載されているものが含まれるが、本明細書ではこれらを参照することにより取り入れることとする。特に有用なポリメラーゼは、*Thermus* 細菌種から得られるものである。好ましい耐熱性酵素は、*Thermus aquaticus*、*Thermus filiformis*、*Thermus flavus*又は*Thermus thermophilus*から得られるDNAポリメラーゼである。他の有用な耐熱性ポリメラーゼは、*Thermococcus litoralis*、*Pyrococcus furiosus*、*Thermotoga* sp. 及び国際特許出願公開WO-A-89/06691号公報(1989年7月27日公開)に記載されているものをはじめとする他の様々な微生物源から得られる。有用な酵素の中には市販されているものもある。生物から天然のポリメラーゼを単離するための技法がいくつか知られており、また組換え技術によるポリメラーゼを調製するためのクローニング法やその他の合成法も、先に引用した技術文献から知られている。

【0029】DNAポリメラーゼコファクターとは、酵素活性に影響を与える非タンパク質化合物をさす。当該技術分野ではこのような物質がいくつか知られており、水性反応混合物中に2価のマンガン又はマグネシウムイオンを放出するマンガン又はマグネシウム化合物が含まれる。有用なコファクターとして、マンガン及びマグネシウムの塩、例えば、塩化物、硫酸塩、酢酸塩及び脂肪酸塩が含まれるが、これらに限定はされない。塩化物、硫酸塩及び酢酸塩といった小さな塩が好ましい。最も好ましい塩は塩化マグネシウム及び硫酸マグネシウムである。

【0030】PCRにはまた、2種以上のデオキシリボヌクレオシド-5'-三リン酸、例えば、dATP、dCTP、dGTP、dTTP及びdUTPのうちの2種以上が必要である。dITPや7-デアザ-dGTPのようなアナログも有用である。PCRにおいて、通常の4種類の三リン酸(dATP、dCTP、dGTP及びdTTP)と一緒に使用することが好ましい。本明細書に記載したPCR試薬は、PCRにおいて標的核酸を増幅するのに適した濃度で提供され且つ用いられる。

【0031】DNAポリメラーゼの最少量は、溶液100 $\mu$ l当たり、一般に約0.5単位以上、好ましくは約2~約25単位、より好ましくは約7~約20単位である。特定の増幅系にはこれ以外の量が有用なこともある。ここで、「単位」とは、74℃において伸長している核酸中へ30分間で10ナノモルの全ヌクレオシド

(dNTP)を取り込ませるに必要な酵素活性量として定義される。各プライマーの濃度は約0.01 $\mu$ モル以上であり、中でも約0.2~約1 $\mu$ モルが好ましい。特定の増幅系ではこれ以外の量が有用なこともある。複数種のプライマーは、同じ量で存在しても異なる量で存在してもよい。

【0032】反応混合物中、DNAポリメラーゼコファクターは一般に約0.5~約20ミリモルの量で存在し、また各dNTPは一般に約0.1~約2ミリモルの量で存在する。特定の増幅系では、これ以外の量のコファクターやdNTPが有用なこともある。

【0033】PCR試薬は、個別に供給すること、又は適当な何らかの緩衝液を用いてpHを約7~約9にした緩衝化溶液において各種の組合せで若しくは全部一緒にして供給することができ、このことについては当該技術分野では大方知られている。増幅に用いられる反応混合物も一般には同様に緩衝化されるが、特定の増幅系ではこれ以外のpH値を採用することもある。

【0034】上記のように、標的核酸は様々な出所源から得られる。一般に、標的核酸は、プライマー、その他の反応物質との接触に利用できるように抽出されなければならない。このことは、通常、望ましくないタンパク質や細胞物質を被検体から適当な方法で除去することを意味する。当該技術分野では、LaureらのThe Lancet, pp. 538-540 (1988年9月3日)、ManiatisらのMolecular Cloning: A Laboratory Manual, pp. 280-281 (1982)、Gross-BellandらのEur. J. Biochem., 36, 32 (1973)及び米国特許出願第4,965,188号明細書(上記)に記載されているものをはじめとする様々な方法が知られている。全血又はその成分からDNAを抽出する方法については、例えば、欧州特許出願公開第393744号公報(1990年10月24日公開)、BellらのProc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (9), pp. 5759-5763 (1981)、SaikiらのBio/Techonology, 3, pp. 1008-1012 (1985)及び米国特許出願第5,231,015号明細書(Cumminsら)に記載されている。

【0035】通常、増幅や検出されるべき標的核酸は二本鎖形にあるため、この二本鎖が分離(すなわち、変性)されなければプライミングは起こらない。プライミングは、抽出工程中に行うことも、またその後の別工程とすることもできる。好ましい変性手段は、好適な温度(本明細書では「第一温度」と称する)へ加熱することである。一般に、この第一温度は約85℃~約100℃の範囲にあり、この温度で最長で数分間、一般には、例えば約1~約40秒の処理を行う。

【0036】次いで、変性された鎖を、適当な組合せの

プライマーを用いて、その反応混合物を一般に約55～約75℃の範囲にある第二温度へ冷却することによりプライムする。冷却は、最長で数分間までの適当な時間で行うが、一般には60秒以内、より好ましくは約5～約25秒間行う。

【0037】変性された鎖を冷却したら、PCR試薬を含有する反応混合物を第三温度において最長で数分間インキュベートする。より一般的には、インキュベーションを1～約80秒間、好ましくは1～約40秒間行い、

プライマー伸長生成物を形成させる。一般に、この第三温度は約55～約75℃の範囲にあり、好ましくは約62～約68℃の範囲にある。

【0038】最も好ましい実施態様では、第二温度と第三温度を同じにし、約62～約68℃の範囲とする。こうして、プライミングとプライマー伸長を、同じ温度において、最長で数分までの適当な時間で実施することができる。この時間は約5～約120秒が好ましく、中でも約10～約90秒がより好ましい。プライマー伸長生成物の形成後、反応混合物を最長で数分間の適当な時間をかけて加熱し、プライマー伸長生成物を変性させる。一般には、反応混合物を約5～約20秒間加熱し、そしてその温度で約1～約80秒間維持して生成物を変性させる。これで一つの増幅サイクルが完成する。

【0039】一般に、PCRは20サイクル以上、好ましくは20～50サイクル行われる。各サイクルは、一般に約20～約360秒のサイクル時間であるが、中でも約30～約120秒が好ましく、さらに約30～約90秒がより好ましい。特定の増幅系ではさらに長いサイクル時間が有用な場合もある。

【0040】増幅系及び増幅法を不連続様式で実施すること、すなわち、サイクルの時間が異なる様式や、試薬の添加、試料の採取のために中断する様式などを採用することはできるが、本発明の方法は、所望の回数について制御された様式で反応混合物の温度を周期変動させるように自動化された連続様式で実施することが好ましい。このために開発された装置がいくつかあり、当業者であれば周知である。

【0041】この目的のための装置の一つが、米国特許出願第4,965,188号明細書及び欧州特許出願公開第236,069号公報にかなり詳しく記載されている。一般に、この装置は、反応混合物を含有する複数の反応管を保持するための熱伝導性容器と、加熱手段と、冷却手段と、温度維持手段と、増幅配列、温度及びタイミングの変化を制御するための信号を発生する計算手段とを含む。

【0042】欧州特許出願公開第402,994号公報は、米国特許出願第5,089,233号明細書（上記）に記載された装置を用いて処理することができる有用な化学試験バックについて詳細に記載している。その中には、本発明の方法に適した反復インターバルで（す

なわち、サイクルにより）試験バックを加熱／冷却するための手段についても記載されている。有用なPCR処理装置に関するさらなる詳細は、当該技術分野の重要な文献から入手することができ、当業者であれば容易に確認することができる。

【0043】上記の化学試験バックの他、本発明の方法は、米国特許出願第4,902,624号明細書（Columbusら）や同第4,683,195号明細書（上記）に記載されているような他の容器、及び当業者であれば明白なその他の適当な容器においても実施することができる。本発明の主な利点は、増幅及び検出を密閉容器内で実施することにより汚染を排除できる点にある。このため、この目的で設計された密閉容器は本発明の均質系による方法を実施するのに適している。検出は、蛍光色素からの発光を測定することにより行われるので、容器はこのような測定を可能にするようなものでなければならない。こうして、容器は、ガラス製であるか、当業者であれば容易に想到する透過性ポリマー製であることができる。

【0044】上記のように、本明細書に記載した蛍光色素を増幅工程中又は増幅工程後の任意の時点で使用して、標的核酸を検出することができる。この色素は、増幅の進行を終始監視できるように、方法の始めから存在させることが好ましい。特定の蛍光色素は、二本鎖標的核酸に結合した場合に、その色素が標的核酸の一本鎖に結合されているときに発生する信号と比較して検出可能な信号を示す。別様式では、二本鎖標的核酸に結合した蛍光色素からの信号は、その色素が遊離形（すなわち、一本鎖核酸にも二本鎖核酸にも結合されていない形態）にある場合に提供される信号と比較することができる。本明細書でいう「検出可能な信号」とは、例えば、発光強度が増大又は低下する変化、励起波長はシフトしないが発光極大波長が（どちらかの方向に）5nm以上シフトする変化、発光波長はシフトしないが励起極大波長が（どちらかの方向に）シフトする変化、励起極大波長と発光極大波長の両方がシフトする変化、又はこれら効果のいずれかの組合せ、のような検出可能な何らかの信号変化を意味する。この検出可能な信号は、発光強度の増大によって明らかになることが好ましい。

【0045】検出可能な信号は、特定の蛍光色素の特定の励起波長及び発光波長に適した何らかの蛍光分光光度計を用いて監視又は検出される。検出可能な信号は、増幅工程中の任意の時点において、すなわち任意の増幅サイクル後に、又は最後の増幅サイクル後に、監視することができる。前者の場合には、少なくともいくつかのサイクルにおいて、増幅を蛍光色素の存在下で実際に行う。

【0046】本発明において有用な蛍光色素は、一般に、結合定数 ( $K_b$ ) が約  $1 \times 10^4$  ～ 約  $5 \times 10^5$  (モル<sup>-1</sup>) である非対称シアニン系色素として定義さ

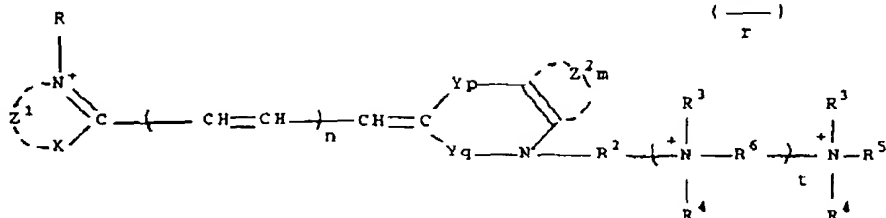


れる。K<sub>0</sub>を定義するために用いられている「約」とは、10%の変動を意味する。また、蛍光色素は、水性反応混合物中の核酸と結合できるように水溶性又は水分散性でもある。用いられる陰イオンによって、蛍光色素は水混和性溶剤に溶解させることができる。

【0047】その上、本発明に有用な蛍光色素は、変数「KC」によってさらに定義される。このKCは、下式：

$$KC = K_0 \times \text{色素濃度 (C)} \times 2$$

\*



【0049】上式中、Xは-S-、-O-、-Se-、=CH-又は-NR<sup>1</sup>-であるが、好ましくは-S-又は-O-である。また、上記構造式(I)において、Yは-CH=CH-である。Rは炭素原子数1~6の置換又は未置換アルキル(例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、t-ブチル、ペンチル及びヘキシル)である。好ましくは、Rは炭素原子数1~3の置換又は未置換アルキルであり、より好ましくは、Rはメチル又はエチルであり、最も好ましくは、Rはメチルである。R<sup>1</sup>は、水素又は先にRについて定義した炭素原子数1~6の置換又は未置換アルキルであることができる。より好ましくは、R<sup>1</sup>は水素又は先に定義した炭素原子数1~3の置換又は未置換アルキルであり、最も好ましくは、R<sup>1</sup>は水素である。

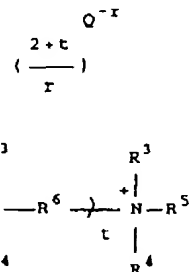
【0050】R<sup>2</sup>及びR<sup>6</sup>は、各々独立に、炭素原子数1~10の置換又は未置換アルキレン(例、メチレン、エチレン、トリメチレン、イソプロピレン、n-ヘキシレン、n-ペンチレン、n-ヘキシレン、n-オクチレン及びn-デシレン)である。好ましくは、R<sup>2</sup>及びR<sup>6</sup>は、各々独立に、炭素原子数1~4の置換又は未置換アルキレンであり、中でもトリメチレンが最も好ましい。R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>及びR<sup>5</sup>は、各々独立に、炭素原子数1~6の置換又は未置換アルキル(例、先にR及びR<sup>1</sup>について定義したもの)である。好ましくは、これらの基は、各々独立に、炭素原子数1~3の置換又は未置換アルキルであり、また各々がメチルであることが最も好ましい。

【0051】Z<sup>1</sup>は、5員又は6員の複素環式環、例えば、ベンゾオキサゾリウム、ベンゾチアゾリウム、ベンゾイミダゾリウム、キノリノ〔2, 3-d〕チアゾリウム、ナフト〔2, 3-d〕チアゾリウム、ナフト〔1, 2-d〕チアゾリウム、ベンゾセレナゾリウム、ピリジ

\*を用いて計算される。ここで、K<sub>0</sub>は分配係数である。有用な蛍光色素は、約20以下の「KC」値を示す。ここで、「約」とは10%の変動を意味する。有用ないくつかの色素、及び本発明の範囲外にあるいくつかの色素についてのKC値を、以下の実施例3に記載する。より詳細には、有用な蛍光色素は以下の構造式(I)で定義される。

【0048】

【化11】



ニウム及びキノリニウム、を完成するのに必要な炭素原子と異種原子を含む。Z<sup>1</sup>により形成された複素環式環には、さらに5員又は6員の芳香族縮合環(炭素環式又は複素環式)が最大で3個まで結合されていてもよい。当業者には、他の環構造についても明白であろう。ベンゾオキサゾリウム環、ベンゾチアゾリウム環及びベンゾイミダゾリウム環が好ましく、中でも最初の2種の環がより好ましい。これらの環は、その様々な位置において、低級アルキル(炭素原子数1~3個)又は当業者には明白な別の何らかの置換基で置換されていてもよいが、但し、このような置換基が、本発明にとって重要な蛍光色素と核酸の結合特性に悪影響を及ぼしたり、水溶液系での化合物の拡散性を望ましくないほど低下させることがあってはならない。

【0052】構造式(I)中、Z<sup>2</sup>は、示されている複素環式環に結合されている5員又は6員の芳香族環を完成するのに必要な炭素原子と異種原子を含む。Z<sup>2</sup>には、さらに芳香族縮合環(炭素環式又は複素環式)が最大で2個まで結合されていてもよい。完成した環がベンゾ環又はナフト環であることが好ましいが、中でもキノリン環をもたらずベンゾ環であることがより好ましい。

【0053】また、構造式(I)中、nは0、1又は2、好ましくは0又は1である。さらに、m、p及びqは、各々独立に、0又は1であるが、但しpとqは同じではない。pとqの少なくとも一方が1であることが好ましく、またpが0で且つqが1であることが最も好ましい。また、tは0、1又は2であり、好ましくは0である。

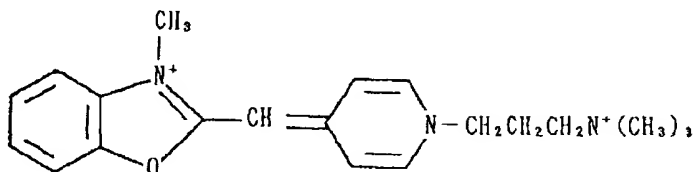
【0054】Qは、適当な電荷を有する適当な酸アニオンである。このようなアニオンには、塩化物、臭化物、p-トルエンスルホネート、メトスルフェート、スルフェート、ニトレート及び当業者には明白なその他、が含

31

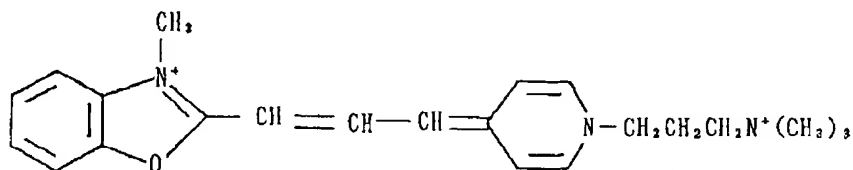
まれる。上記構造式中、rは1又は2である。

【0055】特に有用な蛍光色素は、以下の表1に記載した商品名とK<sub>s</sub>値を有する、Molecular Probes社から市販されているものである。しかしながら、本発明は、Molecular Probes社の色素に特に限定されるものではなく、これらは単に好\*

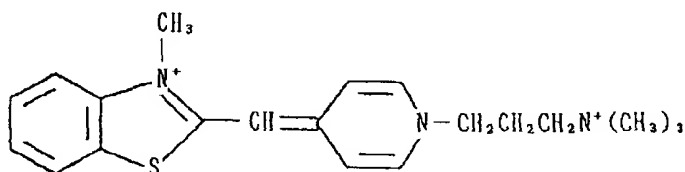
化合物A：



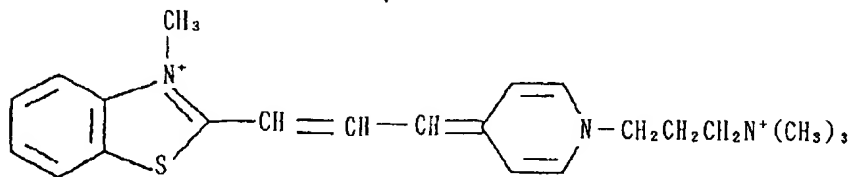
化合物B：



化合物C：



化合物D：



【0057】

【化13】

\*ましい色素である。これらの好ましい色素のカチオンを、以下の化学構造式に例示する。これらの化合物は、適当な任意の2価アニオン又は2個の1価アニオンを含むことができる。ヨウ化物が好ましい。

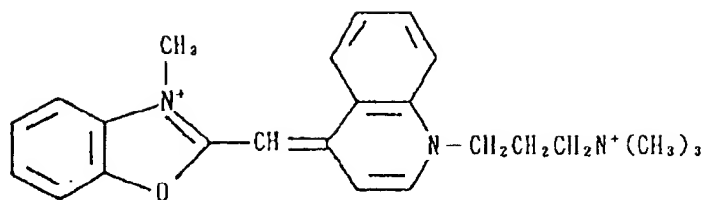
【0056】

【化12】

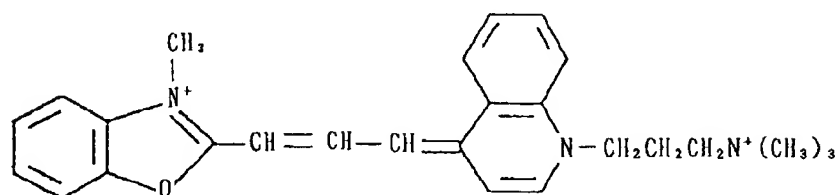
33

34

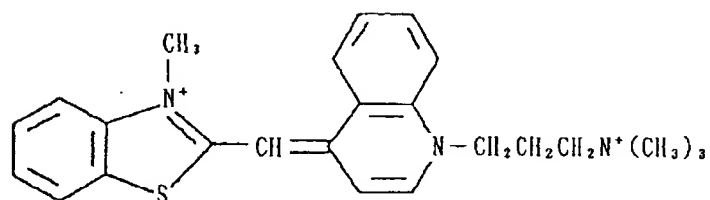
化合物 E :



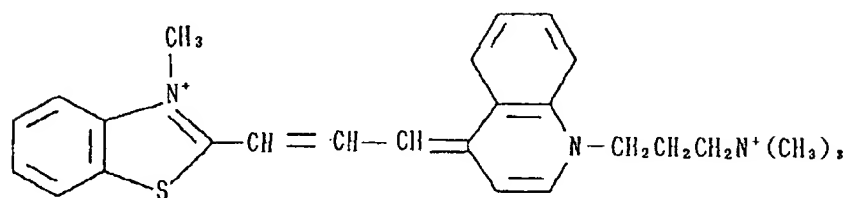
化合物 F :



化合物 G :



化合物 H :



【0058】

【表1】

第 I 表

化合物	商品名	K <sub>s</sub> <sup>*</sup>
A	PO-PRO-1	3.6×10 <sup>4</sup>
B	PO-PRO-3	なし
C	BO-PRO-1	5.8×10 <sup>4</sup>
D	BO-PRO-3	8.7×10 <sup>4</sup>
E	YO-PRO-1	1.5×10 <sup>5</sup>
F	YO-PRO-3	6×10 <sup>4</sup>
G	TO-PRO-1	3.6×10 <sup>5</sup>
H	TO-PRO-3	1.1×10 <sup>5</sup>

40

50

【0059】表中のK<sub>r</sub>値は、Molecular Probes社のカタログ第224頁に報告されている分配係数(K<sub>r</sub>)を水のモル濃度5.5で割って算出された値である。

【0060】本発明を実施する際の蛍光色素の使用量は、結合定数や発光強度が異なるので色素の種類によって変わるし、また存在が疑わしい標的核酸の量によっても変わる。しかしながら、一般には、その使用量は約10<sup>-9</sup>モル以上、好ましくは約10<sup>-8</sup>～約10<sup>-5</sup>モルである。実用上の上限は約10<sup>-5</sup>モルであるが、本発明はこれらの値に限定されるものではない。ここでいう「約」とは、10%の変動を意味する。これらの色素は、ジメチルスルホキシドといった水混和性の有機溶剤を少量含有する水溶液として供給されてもよい。

配列番号：1： 5'-X-ATAATCCACC TATCCAGTA GGAGAAAT-3'

配列番号：2： 5'-X-TTGTCCTT GTCTATGTC CAGAATGC-3'

実施例3で用いたプライマーは、HIV-I DNAのgag領域に相補的である以下の配列を有するものとし※

配列番号：3： 5'-X-AGTGGGGGA CATCAAGCAG CCATGCAA-3'

配列番号：4： 5'-X-CCTGCTATGT CACTTCCCT TGGTCTCTC-3'

【0064】前記プライマー中、Xは、米国特許第4,962,029号明細書(Levenson他)に記載された技法を用いて、2つのアミノテトラエチレングリコール・スペーサー基を介してオリゴヌクレオチドに付加されたピオチニ★

配列番号：5： 5'-X-ATCCTGGGAT TAAATAAAAT AGTAAGAATG  
TATAGCCCTA C-3'

配列番号：6： 5'-X-GAGACCATCA ATGAGGAAGC TGCAGAAT-3'

【0065】これらのプローブを、従来の乳化重合法を用いてポリ〔スチレン-コ-3-(p-ビニルベンジルチオ)プロピオン酸〕(95:5重量パーセント、平均直径1μm)から調製したポリマー粒子(平均直径1μm)に共有結合させた。粒子を水に懸濁させた懸濁液を、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸緩衝液(0.1モル、pH6)で洗浄し、そして固形分が約10%となるように懸濁させた。洗浄した粒子の試料(3.3mL)を希釈して、緩衝液中固形分が3.33%(0.1モル)となるようにし、それを1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(2.1mL, 84mg/mL, 水で調製)およびプローブ(983μL, 44.440D/mL, ナノ純水で調製)と混合させた。得られた懸濁液を水浴中50℃で約2時間断続的に混合しながら加熱し、そして遠心分離した。次いで、(エチレンジニトリロ)四酢酸二ナトリウム塩(0.0001モル)を含むトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液(0.01モル、pH8)で粒子を3回洗浄し、そしてそれに再懸濁して固形分4%となるようにした。粒子上のプローブの最終飽和状態は、約75%であった。

【0066】固形分2%に希釈して、捕捉試薬を、緩衝液中、ポリ〔メチルアクリレート-コ-2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸ナトリウム-コ-

\*【0061】蛍光色素と増幅された標的核酸との接触は、適当な温度で行ってもよいが、好ましくは室温で行われる。色素と核酸の間の反応は、完了まで数分から最長で数時間かかることがあるが、特定のアッセイではこれより短時間又は長時間が有用なこともある。

【0062】以下の実施例は、本発明の実施を説明するためのものであり、本発明を限定するものではない。特に断らない限り、パーセントはすべて重量基準とした。

【0063】

【実施例】

実施例についての材料および方法

実施例1および2で用いたプライマーは、HIV-I DNAのgag領域に相補的である以下の配列を有するものとした。

\*

※た。

★ル部分を表す。実施例1および2、ならびに実施例3のアッセイで用いた捕捉プローブは、それぞれ以下の配列を有するものとした。

2-アセトアセトキシエチルメタクリレート〕(90:4:6重量パーセント)から生成したポリマー接着剤(0.2%)と混合し、そして実施例2に記載したパウチに付着させた。サーマス・アクアティクス(Thermus aquaticus)由来の組換えDNAポリメラーゼは、従来の方法を用いて入手した。10%ジメチルスルホキシド中のYO-PRO-1、YOYO-1、BO-PRO-1、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1およびTOTO-3蛍光色素は、Molecular Probes, Inc.より入手した。

【0067】グリセロールおよびトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン緩衝液は、Sigma Chemicalより入手した。HIV-I標的DNAは、Bernie Poiesz of Syracuse Universityより入手したHUT78/HIV AAV細胞から得た。各細胞は、ほぼ1つのHIV-Iコピーを有するものであった。ポリビニルピロリドン(112ミリモル)およびリン酸ナトリウム、一塩基、一水和物(10ミリモル)を含むものであった。

【0068】実施例2で用いたコンジュゲート溶液は、市販のストレプトアビジンおよび西洋ワサビペルオキシダーゼのコンジュゲート(Zymed Laboratories, Inc., 酵素対ストレプトアビジン比 2:1)(126μL/L, 総タンパク質1.25g)、カゼイン(0.5%)およびメル

37

チオレート (0.5%) を 3- (4-モルホリノ) プロパンスルホン酸緩衝液 (0.1モル) に含むものであった。実施例 2 で用いた洗浄溶液は、塩化ナトリウム (373ミリモル)、(エチレンジニトリロ) 四酢酸二ナトリウム塩 (2.5ミリモル)、デシル硫酸ナトリウム (38ミリモル)、およびエチル水銀チオサリチル酸、ナトリウム塩 (25マイクロモル) を、リン酸ナトリウム、一塩基、一水和物緩衝液 (25ミリモル, pH7.4) に含むものであった。残りの試薬および材料は、市販のものを使用したか、または従来の方法を用いて Eastman Kodak Company

#### 【0069】実施例 1: 増幅した HIV-I DNA の検出

本例は、PCR により増幅した HIV-I DNA を検出するという本発明を具体的に示すものである。最終 PCR 反応混合物は、配列番号: 1 および配列番号: 2 のプライマー (各々 0.4 マイクロモル)、塩化マグネシウム (10ミリモル)、dATP、dCTTP、dGTP および dTTP すべて (各々 1.5ミリモル)、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン緩衝液 (10ミリモル, pH 8)、エチレンジアミン四酢酸 (0.1ミリモル)、塩化カリウム (50ミリモル)、DNA ポリメラーゼ (160 単位/μL) ならびに Kodak 超高純度ヒト DNA (Kodak Ultrapure Human DNA) (0.22 μg/μL)、グリセロール (7.5%) を含むものであった。

【0070】YO-PRO-1 色素 (10 マイクロモル) (前記化合物 E) は、ジメチルスルホキシド (1ミリモル) への保存溶液から、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン塩酸塩 (10ミリモル) およびエチレンジアミン四酢酸 (1ミリモル) 緩衝溶液で希釈することにより調製した。緩衝溶液を反応混合物に添加して、色素濃度を 1 マイクロモルにした。標的 HIV-I DNA (10 コピー/μL) の試料 (200 μL) の PCR による増幅は、Ericomp サーマル・サイクラーおよび以下の PCR プロトコルを用いてマイクロ試験管 (0.5mL) で実施した。

PCR プロトコル:

- 1) 95℃で15秒間予備加熱して変性させる。
- 2) 各サイクルは、63.5℃で40秒間プライミングおよび伸長させ、そして95℃で15秒間変性させる。

38

3) 95℃で60秒間最終変性を行う。

【0071】DNA ポリメラーゼを除くすべての試薬を、前記緩衝溶液と混合させた。得られた混合物を 2 つのマイクロ試験管に等分した (1672 μL/試験管)。緩衝溶液 (220 μL) を一方の試験管に添加した (試料 A) (これは、蛍光色素を含まないものであった)。YO-PRO-1 色素保存溶液 (220 μL) を第 2 の試験管に添加した (試料 B)。次いで、DNA ポリメラーゼ (88 μL) および標的核酸 (220 μL) を各試料に添加した。各試料の内容物を各々 200 μL ずつの 10 のアリコートに分割し、別々のマイクロ試験管に入れ、そして前記のような PCR にかけた。各々 0、5、10、15、20、25、30、40 および 45 サイクル行った後に、試験管を開けた。次いでその試験管の内容物を希釈して (反応混合物 100 μL と濃度 1 マイクロモルの色素溶液 3900 μL とを蛍光計のキュベットに入れて最終流体容量 4 mL とした)、その蛍光を市販の Perkin-Elmer LS-5B 分光蛍光計 (491nm で励起、509nm で発光) で測定した。

【0072】これらの測定結果を、蛍光強度対 PCR サイクル数のプロットである図面に示す。曲線 1 は、開始時には色素を全く存在させなかったが、所定の PCR サイクル数後に試料を取り出したときに色素を添加した、試料 A についての結果を表すものである。曲線 2 は、増幅工程全体を通して色素を存在させた、試料 B についての結果を表すものである。YO-PRO-1 色素は、増幅工程全体を通して存在させた場合でも、PCR に悪影響を及ぼさなかったことが認められる。バックグラウンドの蛍光は、30 回目の PCR サイクルまでは、約 7~9 蛍光単位のレベルではほぼ一定であったが、その後蛍光が増加し始め、45 回目の PCR サイクルで約 20 蛍光単位に到達した。これは、最初のバックグラウンド信号とは明らかに区別される。

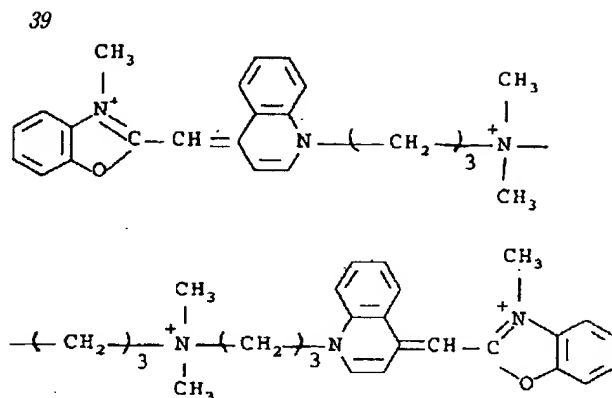
#### 【0073】実施例 2: 比較例

本発明の方法を、前記緩衝溶液中で YOYO-1 (最終濃度 1 マイクロモル) および 4 価の蛍光色素を用いて実施した、本発明の範囲外の増幅および検出方法と比較した。この色素は以下の構造を有する。

【0074】

【化 14】

40



【0075】自蔵式化学パウチ、例えば、米国特許第5,229,297号明細書 (Schnipelsky 他) に記載されているものを用いて増幅を実施した。これらのパウチには、配列番号：5の捕捉プローブを付着させた粒子を、反応が起こる検出チャンネルに固定化した。以下のように、パウチに試薬を充填した。実施例1のPCR反応混合物 (DNAポリメラーゼを除く) を容量5472 $\mu$ Lほど調製した。得られた混合物を、それぞれ試料A、BおよびCを代表する試験管A、BおよびCに等分した (各々1824 $\mu$ L)。試験管A中の試料を緩衝液 (220 $\mu$ L) で希釈し、そしていかなる蛍光色素も存在させることなく増幅させた。得られた生成物を定量的に検出するために、増幅の最後に色素を添加した。

【0076】PCR試薬に加えて、試験管B中の試料には、YOYO-1蛍光色素 (0.1マイクロモル) を増幅の前に添加して (10マイクロモル溶液を 220 $\mu$ L) 含ませた。また、試験管C中の試料には、YO-PRO-1蛍光色素 (0.1マイクロモル) を増幅の前に添加して (10マイクロモル溶液を 220 $\mu$ L) 含ませた。次いで、DNAポリメラーゼ (88 $\mu$ L) および標的HIV-I DNA標的核酸 (220 $\mu$ L) を各試験管に添加し、そして3つの試験管の各々の内容物を用いて、8つのパウチのPCR試薬室を満たした。実施例1と同じ方法を用いて、増幅を実施した。PCRプロトコールは、以下のサーマル・サイクラーを用いて40サイクルを同様に実施した。

- 1) 95℃で60秒間予備加熱して変性させる。
- 2) 各サイクルは、63.5℃で40秒間プライミングおよび伸長させ、そして95℃で10秒間変性させる。
- 3) 95℃で60秒間最終変性を行う。

【0077】増幅の結果を、3種の方法：(1) 0 (信号なし) から10 (最高信号濃度) までのカラー色素スコアを目視的に評価すること、(2) エチジウムブロミド染色電気泳動ゲル、および(3) 市販のPerkin Elmer蛍光計での蛍光の測定、により検出した。パウチに固定化された捕捉プローブを用いて、5分間42℃でインキュベーションする間に増幅した標的をハイブリダイズして、前記色素スコアを得た。固定化標的をコンジュゲート溶液 (前記) と1分間30℃で接触させ、続いて洗浄溶液と1

分間55℃で接触させた。次いで、ロイコ色素溶液を30℃で添加し、そして2分間30℃でインキュベーションした後、得られた色シグナルを観察した。

【0078】電気泳動は、市販のNuSieve 1.5 %/Seakem Agarose 1 %ゲル (2.5%アガロースに改質) およびエチジウムブロミド染料を用いて実施した。試料を、従来のTBE緩衝液 (4 $\mu$ L / 100 $\mu$ L) 中のゲルに塗布した。各試料 (A、BおよびC) の三重反復アッセイを、各検出手段を用いて実施した。各検出手段についての平均結果は以下の通りであった。

【0079】

【表2】

ロイコ色素由来の色スコア：

試料	平均色スコア
A	5.3
B	0
C	6

【0080】これらの結果は、試料CではYO-PRO-1色素の存在により増幅が悪影響を受けなかったことを示している。しかしながら、試料BではYOYO-1色素の存在が増幅を阻害した。試料Aは陽性対照として用いた。

【0081】

【表3】

電気泳動の結果：

試料	陽性/陰性ゲル・バンド
A	4本のバンド中4本とも陽性
B	5本のバンド中5本とも陰性
C	5本のバンド中5本とも陽性

【0082】これらの結果は、前記色素スコアと一致する。また、試料Aは陽性対照として用いた。試料Bで用いたYOYO-1色素は増幅を停止させるが、一方試料Cで用いたYO-PRO-1色素は増幅を促進させた。両方の色素について以下の波長：

励起： 491nm

発光： 509nm

で、Perkin-Elmer LS-5B蛍光計を用いて蛍光信号を発生させた。各増幅生成物の混合物を、各色素溶液へ添加して 100×に希釈した（最終濃度 1 μモル）。増幅試薬混\*

#### 蛍光測定結果：

試料	蛍光単位
バックグラウンド (YOYO-1)	0.09
バックグラウンド (YO-PRO-1)	0.03
試料 A *	3.6, 3.7, 3.4, 3.0
試料 A **	7.1, 6.6, 6.0, 6.0
試料 B	1.5, 1.5, 1.5, 1.4, 1.4
試料 C	3.7, 3.5, 3.6, 3.2, 2.8

#### 【0084】

★ 増幅の後にYO-PRO-1を添加した。

★★ 増幅の後にYOYO-1を添加した。

これらの結果は、YOYO-1が高い核酸染色性を有すると同時に、それが増幅過程を著しく阻害するので増幅中に使用することができないことを示している。YO-PRO-1は全体の信号は低い、増幅中に試薬混合物の中にそれを含ませることができる。前記増幅プロトコルを、(a) サイクルを60回行うこと、(b) 各サイクルの変性時間を20秒間に延ばすこと、または(c) プライミング/伸長工程を60秒間に延ばすこと、により改変することにより、別の増幅および検出実験を実施した。これらのプロトコルの変更により、(a) のみがYOYO-1の存在下でいずれか測定可能な差異を生じさせるようであった。その差異は小さく、蛍光で検出可能であるが、しかしゲル電気泳動もしくは色信号では検出不可能であった。

#### 【0085】実施例3：蛍光色素のさらなる比較

\* 化合物および各色素の混合物より、バックグラウンド信号が得られた。これらの結果を以下に示す。

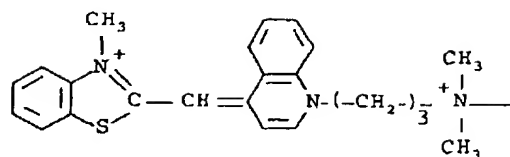
【0083】

【表4】

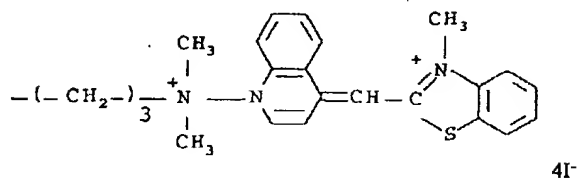
実施例2の実験と同様な増幅実験を実施して、幾つかの別の蛍光色素染料の有用性を評価した。これらのアッセイでは、前記配列番号：3および配列番号：4のプライマーを使用し、そして前記配列番号：6のプロープを使用した。色スコアを作製して、所定の実験で増幅が起こったことまたは起こらなかったことを確認した。共通な最低限の信号を提供するように、すべての増幅した試料をYOYO-1の溶液（0.1マイクロモル）と混合したことを除いて、実施例2に記載したように蛍光を測定した。本発明の実施に際して有用であることが見出された蛍光色素は、YO-PRO-1（化合物E）、BO-PRO-1（化合物C）、TO-PRO-1（化合物G）およびTO-PRO-3（化合物H）であった。概ねPCRを阻害したために有用ではない色素は、YOYO-1（前記）および以下に示されるものであった。

【0086】

【化15】

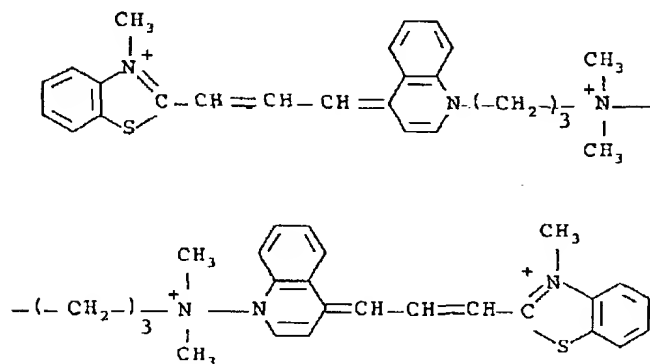
43  
TOTO-1

44



41-

TOTO-3



41-

【0087】下記第II表に、本例の実験において試験した色素についての蛍光信号および「KC」値を列挙する。これらの20以下の「KC」値を有する色素が、受け入れられる蛍光信号を提供したことは明らかである。

【0088】

【表5】

第II表		
色素	蛍光信号	「KC」値
BO-PRO-1	19.6	3.2
TO-PRO-3	15.5	6.2
YO-PRO-1	16	8.2
TO-PRO-1	8.32	20
TOTO-3	8.45 *	25
YOYO-1	2.18	60
TOTO-1	2.70	110

【0089】★ TOTO-3はある実験で高い蛍光信号を提供したが、反復可能な結果を得ることは難しく、一方、別の色素由来の結果は反復可能であった。従って、TOTO-3についての前記値の信頼性は低い。本発明をその好ましい態様を特に参照して詳細に記載して

きたが、変更および修正が本発明の精神および範囲内で可能であることは理解されるであろう。

【0090】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド (HIV-I DNA のプライマー)

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

ATAATCCACC TATCCAGTA GGAGAAAT 28

【0091】配列番号：2

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド (HIV-I DNA のプライマー)



45

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: No

配列

TTTGGTCCTT GTCTTATGTC CAGAATGC 28

【0092】配列番号: 3

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド (HIV- 10

I DNA のプライマー)

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: No

配列

AGTGGGGGA CATCAAGCAG CCATGCAA 28

【0093】配列番号: 4

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド (HIV-

I DNA のプライマー)

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: No

配列

CCTGCTATGT CACTTCCCCT TGGTCTCTC 30

46

【0094】配列番号: 5

配列の長さ: 41

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド (HIV-I DNA のプローブ)

ハイボセティカル配列: No

アンチセンス: No

配列

ATCCTGGGAT TAAATAAAAT AGTAAGAATG TATAGCCCTA C 41

【0095】配列番号: 6

配列の長さ: 28

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成オリゴヌクレオチド (HIV-I DNA のプローブ)

ハイボセティカル配列: No

20 アンチセンス: No

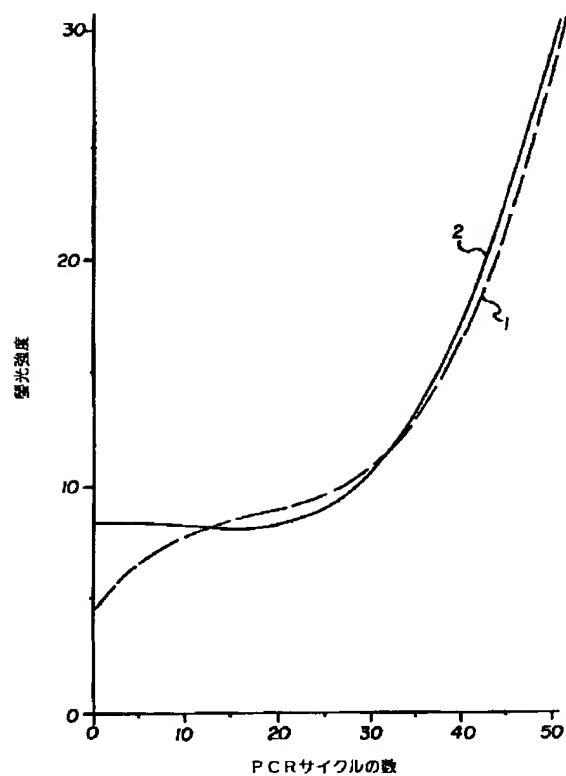
配列

GAGACCATCA ATGAGGAAGC TGCAGAAT 28

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、PCRサイクル数に対して蛍光強度をプロットしたグラフである。

【図 1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>

C 0 9 K 11/06

C 1 2 N 15/09

G 0 1 N 21/64

21/78

33/58

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

Z 9280-4H

Z N A

Z

C

A